O METODACH

BADANIA i HODOWLI BAKTERYJ,

jakotéż

o związku tychże z chorobami zakaźnemi.

PRZEZ

Dra BOSSOWSKIEGO,
elewa kliniki chirurgicznéj w Krakowie.

W KRAKOWIE,
W DRUKARNI UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
pod zarządem Ignacego Stelcla.
1885.

(Osobne odbicie z „Przeglądu Lekarskiego").

O metodach badania i hodowli bakteryj, jakotéż o związku tychże z chorobami zakażnemi.

(Rzecz odczytana na posiedzeniu Towarzystwa lekarskiego z d. 6 maja)

przez Dra Bossowskiego,
elewa kliniki chirurgicznéj w Krakowie.

Panowie! Nauka o pasorzytach drobnowidowych oparta na powadze bezpośredniego doświadczenia nie zbyt odległéj sięga przeszłości. Pierwsze pewne daty w téj mierze odnoszą się do r. 1828, gdy Ehrenberg odkrył w wodzie i kurzu twory mikroskopowe, a zaliczył je do wymoczków. W dziesięć lat późniéj Schwann proces fermentacyi i gnicia tłumaczy przez działanie organizmów, w które obfituje trwale powietrze atmosferyczne. Odtąd rozpoczyna się walka między badaczami szukającymi na drodze chemicznéj wyjaśnienia gnicia i kiśnienia, a zwolennikami świeżo rozbudzonéj teoryi żyjątek. Na czele pierwszych stanął Liebig i Hoppe-Seyler, niespożyte zasługi w kierunku drugim położył Pasteur, pomimo że poglądy jego z biegiem czasu pod wpływem dalszych doświadczeń i udoskonalonego badania znacznym uległy przemianom.

Prawie równocześnie z podjęciem zabiegów celem wyjaśnienia sprawy gnicia i fermentacyi budzi się żywsze zajęcie około chorób zakażnych i ożywia się dawno rzucona myśl co do analogicznéj ich przyczyny i pochodzenia. Lecz tutaj utrudniona i żmudniejsza droga, częściéj prowadząca

na manowce, opóźniła stwierdzenie domysłów i rozumowań pełnych wprawdzie bystrości i siły przewidywania bez podstawy jednak dowodowéj. Tak wzięła początek gałąź nauki, zwana dziś bakteryjologiją, odkrywająca nam świat całkiem nowy, dawniéj nieznany, częstokroć stojący na granicy widzenia, którego naturę roślinną ugruntował pierwszy Cohn a Nägeli ochrzcił mianem schizomycetów, działkogrzybków. Wykrycie przez Pollendera w r. 1855 tworów prątkowych krwi w przebiegu wąglika, stwierdzone bezpośrednim dowodem ich siły zakaźnéj, zdawało się już zapowiadać piękną i bogatą w rezultaty przyszłość. Nie brakło téż badaczy, którzy zachęceni dotychczasowém powodzeniem z gorączkowym pośpiechem jęli się dalszych prac w tym kierunku, których jednak wyniki nieoparte na ścisłém doświadczeniu i dla tego niewolne od błędów zachwiały na długo przekonanie i wiarę w całą naukę, wstrząsnęły tak mozolnie zdobytemi już pewnikami. Lecz klęska ta nie była snać wystarczającą, bo niemniéj i dziś jeszcze, gdy dalsze sumienne i genijalne prace na udoskonalonych metodach oparte wskrzesiły na nowo ducha i wzbudziły dla siebie uznanie, spotkać się można z nieoględnymi pracownikami, którzy niepomni na ważność przedmiotu, z dziwną, choć podziwienia godną, szybkością odkrywają światu własne błędy i usterki, narażając w ten sposób naukę na zarzut i powątpiewanie.

Niedający się zaprzeczyć postęp w rozwoju nauki mikroorganizmów zapisać trzeba od chwili, gdy odkryte ustroje poczęto hodować na odpowiednich sztucznych materyjałach odżywczych celem poznania warunków i objawów ich życia, jakotéż sposobu ich działania. Pochop w tym kierunku dany już przez Pasteura podtrzymywali daléj skutecznie Klebs i Cohn a nie mało również na tém polu działali Nägeli i Brefeld. Myśl sama przez się cenna i wiele obiecująca, trudniejsza była do przeprowadzenia, niżli się to zdawało pierwszym twórcom sztucznych hodowli. Pominąwszy już błędy i wady, biorące swój początek z nieudolnego, a mało ostrożnego postępowania badaczy, gło-

wnego źródła złego szukać należy w środkach, jakiemi się do tych celów posługiwano. Nie uwzględniając bowiem małych różnic w składzie materyjału odżywczego, zalecanego przez Pasteura, Cohna i Nägelego, byłyto ciecze, rozczyny i właśnie dla tego najmniéj przydatne do zamierzonego celu. Pomijając już trudności sterylizowania pewnych rozczynów, jak wyciągu mięsnego lub słodowego, t. j. wyplenienia pierwotnie w nich zawartych organizmów, nie podobna było rozciągnąć dostatecznéj kontroli co do zanieczyszczeń następowych, od których najostrożniejsze postępowanie, najlepsza wprawa i biegłość zabezpieczyć sztucznych hodowli do dziś dnia nie są w stanie. Łatwo bowiem zrozumieć, że wobec rozległego rozszerzenia mikroorganizmów w naszém otoczeniu, wobec panspermii w ścisłém znaczeniu tego słowa, krótki czas tylko trwające odemknięcie naczynia hodowlanego grozi wtargnięciem obcych ustrojów. Obecność nowych przybyszy w płynnym ośrodku długo nie zdradzi się zmianą makroskopową, a nawet mikroskop nie daje możności wykrycia w kropelce cieczy wziętéj do badania pośród całéj masy jednorodnych organizmów kilku pojedyńczych odmiennych form. Dopiero później, gdy przy następnych przeszczepianiach zanieczyszczające ustroje dostatecznie się rozwiną, zmieni się niezawodnie obraz mikroskopowy, lecz chwila poznania przychodzi za późno, tak, że hodowla jest bez ratunku stracona. Dla tych téż powodów o czystych hodowlach jednorodzajowych z tych czasów mowy jeszcze być nie może, tém téż łatwo tłumaczą się wielokrotnie i upornie głoszone zdania o przechodzeniu jednych rodzajów organizmów w drugie.

Nowe całkiem tory bakteryjologii wytknął, można powiedzieć, dopiero Koch przez nadanie cieczom odżywczym formy stałéj i wykształcenie znakomite całéj metody badania i hodowania bakteryj. Z chwilą wejścia w życie genijalnych jego sposobów rozpoczyna się całkiem nowy zwrot w badaniu, z podjęciem prac w duchu jego szkoły mnoży się szereg płodnych w wyniki poszukiwań, dla których wspaniałym drogoskazem są dzieła samego Kocha.

Żywo czując całą niedołężność dotychczasowego postępowania, zwrócił Koch przedewszystkiém uwagę na hodowle sztuczne bakteryj, uważając je słusznie jako punkt ciężkości ścisłego badania chorób zakaźnych. Porzuciwszy hodowle w rozczynach zalecił użycie formy stałéj odżywek, ilustrując ich znaczenie na przekroju gotowanego ziemniaka, wystawionego czas jakiś na działanie powietrza atmosferycznego. Powierzchnia takiego ziemniaka, zależnie od ciepłoty otoczenia, już drugiego lub trzeciego dnia pokryta będzie małemi kroplami, t. j. pojedyńczemi kolonijami organizmów, które okazują charakterystyczne różnice pod względem swéj barwy i kształtu. Są one następstwem osadzenia się z powietrza zarodków rozmaitych organizmów i przedstawiają badane mikroskopowo gromady jednorodnych tworów, a więc czyste tychże hodowle w ścisłém znaczeniu tego słowa, biorące początek z pojedynczego zarodka. Pojedynczo na przekrój innego ziemniaka przeszczepione wydadzą jedyną formę ustrojową, zachowując dokładnie téż same charakterystyczne cechy, jak kolonija macierzysta.

Całkiem inaczéj kształtują się téżsame stosunki w ośrodkach ciekłych, i tu niemniéj wcisną się z powietrza téżsame rodzaje organizmów, ale rozwój ich całkiem inaczéj będzie się odbywał. Ruchem obdarzone ustroje szybko przenikną rozczyn zaburzając rychło spokój nieruchomych kolonij i rozrywając takowe, część jedna osiedli się w górnych warstwach, druga przeważnie na dnie cieczy, słowem ciecz w całości przedstawiać będzie zamęt najrozmaitszych form i rodzajów, nieprzypominający w niczém czystéj i jednorodnéj hodowli. W tém zachowaniu się leży cała wyższość substratów stałych, iż przeszkadzają pomieszaniu się wzajemnemu różnych rodzajów, któremu sprzyja nader korzystnie forma ciekła ośrodków odżywczych. Do zamienienia rozczynów odżywczych w stałe używa Koch gelatyny zrazu w ilości 5%, obecnie 10% lub agaru, istoty klejowatéj roślinnéj otrzymywanéj z rodzaju *Gracilaria lichenoides* i *Gigartina speciosa* dodawanéj w ilości 2%. Zresztą skład ośrodków winien odpowiadać warunkom życia hodowanych organizmów. Do ho-

dowli schyzomycetów najkorzystniejszym okazał się obojętny lub słabo alkaliczny rozczyn peptonu i soli kuchennéj w nalewce mięsa wołowego, stężony za pośrednictwem gelatyny lub agaru. Przyrządzenie powyższych substratów wymaga zachowania wszelkich prawideł ostrożności, mających na celu wytępienie już zawartych w nich organizmów, jakotéż ochronienie ich nadal od możliwych zanieczyszczeń. Wszystkie tedy naczynia poddaje się ścisłéj dezinfekcyi za pomocą wysokiéj ciepłoty 150—160°C., rurki odczynnikowe, do których zlewa się przyrządzony materyjał odżywczy gotujący się, zamyka się szczelnie odkażonym czopem waty. Płynna zrazu gelatyna lub agar krzepną po kilku godzinach w zamkniętych rurkach szklannych i dają stały a zarazem przeźroczysty materyjał odżywczy bezpośrednio do badania mikroskopowego się nadający. Niemniéj dobrym a w pewnych razach i dla pewnych rodzajów jedynie tylko zastosować się dającym jest grunt z surowicy krwi pospolicie baraniéj, ogrzanéj aż do stężenia. Dość trudna zresztą do sterylizowania surowica krwi należycie przyrządzona winna mieć zbitość białka kurzego na twardo ugotowanego, barwę bursztynu, winna przeświecać i tylko w dolnych częściach, gdzie warstwa jest nieco grubsza okazywać zmętnienie mleczne. Również ziemniaki w należyty sposób oczyszczone od wszelkich zarodków, i ugotowane przy pomocy pary płynącéj, stanowią dla znacznéj części schyzomycetów wyborny materyjał odżywczy, lecz podczas gdy przechowanie hodowli czystych w gelatynie, agarze lub surowicy z łatwością w rurkach odczynnikowych się udaje, to hodowle na ziemniakach wymagają po pierwsze żmudniejszego odkażenia materyjału samo przez się mocno zanieczyszczonego, a przechowanie ich z większym trudem połączone daje w rezultacie mniejsze korzyści niż jeden z sposobów z wyż przytoczonych. Korzystniejszą téż bezsprzecznie jest miazga kartoflowa otrzymana przez zarobienie roztartych ugotowanych ziemniaków z wodą i dodatkiem stosownie do rodzaju hodowanych organizmów skrobi, cukru, peptonu lub wyciągu mięsnego, którą wprowadza się do małych kolbek i zamyka szczelnie czopem

sterylizowanéj waty. Małe odmiany w składzie opisanych materyjałów odżywczych, mianowicie: gelatyny odżywczéj i agaru, polegające na dodatku cukru gronowego lub trzcinowego, lub na zastąpieniu nalewki mięsnéj wyciągiem mięsnym, mają więcéj znaczenie podrzędne a nie zmieniają bynajmniéj istoty cieczy. Nieoceniona wyższość formy stałéj pożywek tak dalece wyparła ciecze, że dziś jedynie do hodowli w tak zwanych komorach szklanych, składających się z wydrążonego szkiełka przedmiotowego i pokrywy z szkiełka nakrywkowego, bywają używane, gdzie cała hodowla złożona z kropli rozczynu zawieszonéj na dolnéj powierzchni szkiełka nakrywkowego w całości pod mikroskopem z łatwością skontrolować się daje pod względem swéj czystości. Surowica krwi, bulijon, *humor aqueus* i nalewki roślinne należycie sterylizowane wchodzić mogą w skład tych ostatnich hodowli.

Rurka odczynnikowa zawierająca stężały rozczyn nalewki mięsnéj i peptonu, bez względu na to, czy zawiera gelatynę lub agar, mający tę wyższość, że wytrzymuje ciepłotę do 40°C. bez rozpłynięcia się, podczas gdy gelatyna już przy 25°C. staje się płynną, jest znakomitym środkiem służącym do przechowania hodowli czystych, z jednorodnych organizmów się składających; zawodzi jednak, jeśli zaszczepimy doń mięszaninę z kilku rodzajów złożoną. Równie korzystne znajdując dla siebie warunki bytu, rozwijać i rozmnażać się one będą, póki żywsza siła wzrostu jednego nie pokona drugiego, a zwykle z walki téj uwłaczającéj pojęciu hodowli czystéj wypłynie mniéj pożądany i oczekiwany organizm. Dla tych powodów szukać należy innego wyjścia, a dwie tylko możliwości nastręczają się tutaj, a mianowicie wszczepiać w rurki odczynnikowe z samego zawiązku czysty, jednorodny materyjał, co przecież w wielu razach wprost będzie niemożliwém lub pojedyńcze rodzaje z materyjału wszczepionego starać się odosobnić i jedynie pożądane przeszczepiać. Drogą prowadzącą do ostatniego celu są tak zwane hodowle na płytach szklanych, których zasady dopatrzeć się nie trudno w tak zwanych frakcyjonowanych hodo-

wlach Klebsa. Myśl Klebsa, niewdzięcznie dla hodowli w rozczynach podaną, przeszczepił Koch na grunt swych stałych ośrodków i wzbogacił metodę o jedno jeszcze ogniwo, jakiego brakło do zupełnéj doskonałości.

Zaletą hodowli na płytach jest po pierwsze, rozdzielenie wszczepionego materyjału do tego stopnia, że z pojedynczych odosobnionych zarodków rozwijają się pojedyńcze gromadki jednogatunkowych organizmów; druga niemała ich wartość polega na możnosci kontrolowania ich mikroskopem, przy pomocy którego nietrudno rozróżnić cechy i właściwości pojedynczych kolonij. Małą cząsteczkę badanego materyjału przenosi się do rurki z gelatyną odżywczą, która przez ogrzanie w łaźni wodnéj do 40°C. przeszła w stan ciekły, sprzyjający dokładniejszemu rozdzieleniu wprowadzonéj substancyi, do czego poruszanie, wstrząsanie i pochylanie rurki z łatwością prowadzi. Z pierwszéj rurki zawierającéj już w znaczném rozdzieleniu materyjał badany, wyjęta jedna do dwóch kropel zakaża rurkę drugą w ten sam sposób przygotowaną, zkąd przenosić można również małe ilości do rurki trzeciéj a nawet czwartéj. Płynną jeszcze gelatynę wylewa się na płyty szklane, należycie wysterylizowane w ciepłocie 150 do 160°C., a po skrzepnięciu ustawia się je na odpowiednich ławeczkach w tak zwanych wilgotnych komorach szklanych. Płyta pierwsza bywa zazwyczaj tak gęsto zasiana, że o oddzieleniu z niéj pojedyńczych kolonij mowy być nie może. Na płycie drugie lub dopiero trzecie rozcieńczenie zawierającéj zejdą drugiego lub trzeciego dnia pojedyńczo i dość daleko od siebie rozsiane kolonije, które wyszły na pewno z jednego zarodka i przedstawiają czyste hodowle pojedyńczych gatunków w materyjale pierwotnym zawartych. Badanie bezpośrednie pod mikroskopem wykaże odmienny kształt i rodzaj składających je organizmów, z łatwością już teraz do rurek odczynnikowych z osobna przeszczepić się dających. Jeśli kolonije zbyt gęsto są rozmieszczone, przeszczepianie udaje się najlepiéj pod przewodnictwem mikroskopu, przez wkłucie drutu platynowego haczykowato zagiętego w odpowiednią koloniję. Ślad gela-

tyny pozostający na druciku przeniesiony do rurki odczynnikowéj wyda po kilku dniach wśród sprzyjających okoliczności piękną jednorodną hodowlę oddzielonego organizmu. W ogólności do szczepień wszelkiego rodzaju posługujemy się drutem platynowym zatopionym w pręciku szklanym, który przed każdém użyciem poddać należy dezinfekcyi przez ogrzanie go do czerwoności.

W hodowlach organizmów, których wzrost i rozmnażanie udaje się jedynie w surowicy krwi wyrzec się trzeba zastósowania sposobu oczyszczenia przez wylanie rozcieńczonego materyjału na płyty szklane, tém więcéj, gdy odnośne organizmy zbyt wolno rosnąc w obec szybkiego rozwoju innych ostać się nie mogą. W tych więc przypadkach pozostaje nam jedyna droga, o któréj już wspomniałem, tj. wszczepianie w rurki odczynnikowe z surowicą materyjału zawierającego li tylko jednorodzajowe organizmy, wolnego zaś zresztą od domieszek obcych ustrojów. Przysposobienie tak nienagannego materyjału niemałych wymaga ostrożności, nawet gdy wprawa i biegłość stoją po stronie badającego; Koch pierwszy dał przykład, jak w tych razach postępować należy, osiągnąwszy z nieświeżych zwłok grużliczych wzorowe hodowle prątków tuberkulicznych.

Przeszczepione do rurek odczynnikowych organizmy pozostawia się, stósownie do warunków ich życia, w zwykłéj ciepłocie pokojowéj, lub umieszcza się w aparatach wylęgowych, których urządzenie i sposób użycia będę miał zaszczyt przedstawić Panom w pracowni kliniki chirurgicznéj, tu tylko wspomnę, że warunkiem dobrego aparatu jest utrzymanie ciepłoty uznanéj za najkorzystniejszą dla rozwoju danego organizmu stale na jednym punkcie, tak, że wahania 0·1° wynoszące jedynie mogą znaleźć usprawiedliwienie. Piec wylęgowy d'Arsouwala, zaopatrzony błoną regulującą Schlösinga, łącznie z dobrym regulatorem gazu, funkcyjonującym po za przyrządem, odpowiada najzupełniéj wymaganiom, utrzymując stale przez całe tygodnie ciepłotę z góry oznaczoną. Jestto rzeczą niemałéj wagi zwłaszcza w przypadkach tak subtelnych, jak osłabianie siły zakażnéj wąglika,

gdzie już różnica 0·5 stopnia wynosząca wywiera niemały wpływ na przebieg doświadczenia.

Ziemniaki pokryte hodowlami pozostawia się w zwyczajnéj ciepłocie pokojowéj lub ciepłocie pieca węglowego, pod ochroną dzwonów szklanych, niedopuszczających jednak szczelnego odcięcia dostępu powietrza i dla tego przechowanie tego rodzaju hodowli czystych nie udaje się zazwyczaj dłużéj nad dni kilkanaście. Utrzymanie ich przez czas dłuższy wymaga odrębnie urządzonych naczyń w kształcie wąskich cylindrów, lecz w obec szybkiego zasychania gruntu odżywczego i w ten sposób wywołanéj zmiany stosunków, przekładanie w ogóle tego substratu nad inne mało popłaca, chyba że zmuszają nas do tego niezbędne warunki rozwojowe.

Znaczenie hodowli czystych jednogatunkowych jest tak doniosłe, że śmiało powiedzieć można, iż dopiero z chwilą osiągnięcia tego celu zyskało badanie organizmów pewne i racyjonalne podstawy. Odosobniając jeden gatunek ustrojowy z szeregu wielu mącących jego studyjum umożliwia hodowla czysta szczegółowe zbadanie warunków i objawów jego życia, wpływów korzystnie lub zgubnie na jego rozwój działających. Oczyszczając wreszcie przez wielokrotne przeszczepianie organizmy od produktów chorobowych zrazu z niemi przeniesionych, którym tak wielką aż do ostatnich czasów kazano odgrywać rolę, daje nam w rękę sposób rozstrzygnięcia, czy dotyczące organizmy są jedynie objawem towarzyszącym bez głębszego znaczenia, czy też jedyną i istotną przyczyną choroby.

Związek bowiem, jaki zachodzi między chorobą a organizmami wśród jéj przebiegu napotykanemi w chorém ciele, dopuszcza dwojaki sposób tlumaczenia, albo pasorżyt jest tylko tworem przypadkowym, nic zresztą wspólnego z chorobą niemającym, który wegetuje w zmienionem chorobowo ciele, lub też jest rzeczywistą przyczyną, twórcą rozgrywającéj się choroby. Niewątpliwie dość będzie przyczyn skłaniających do przechylenia się w kierunku drugim, jeśli w k a ż d y m p r z y p a d k u d o t y c z ą c é j c h o r o b y znaj-

dą się wybitnie pod względem morfologicznym scharakteryzowane ustroje drobnowidowe, jeśli ilość ich i rozdzielenie będzie tego rodzaju, że wytłumaczy wszystkie objawy chorobowe, jeśli wreszcie organizmy te oddzielone z chorego ciała i przez hodowle czyste uwolnione od wszelkich produktów chorobowych wzniecą po zaszczepieniu najmniejszych ilości w wyższym ustroju zwierzęcym znowu tenże sam charakterystyczny proces chorobowy, stwierdzając w ten sposób wymownie przez zdolność rozwijania i rozmnażania się w organizmach zwierzęcych swe działanie chorobotwórcze a zarazem zakaźne.

Wykazanie bakteryj wśród organizmu czyto we krwi, ropie lub tkaninach, wymaga użycia pewnych metod i środków, o których w krótkości zamierzam jeszcze zdać sprawę. Wysłany przez prof. Mikulicza, którego staraniom wyłącznie zawdzięczyć mogę przystęp do pracowni Kocha, pragnę przedstawić Panom bieg postępowania wytknięty badaniom bakteryjologicznym w berlińskim Urzędzie zdrowia. Miłym też dla mnie obowiązkiem będzie złożenie na tém miejscu czcigodnemu memu przewodnikowi za poparcie i cenne wskazówki życzliwie mi ofiarowane, skromnych wyrazów głębokiéj mojéj wdzięczności.

Podczas gdy wyśledzenie bakteryj w stanie niezabarwionym, oparte na własności tychże opierania się kwasom i alkalijom, a poprzednio ogólnie i wyłącznie praktykowane, napotyka na bardzo znaczne, nierzadko nieprzezwyciężone, trudności i przeszkody z powodu często minimalnych tychże rozmiarów i nader prostego ukształtowania, to własność bakteryj żywego przyjmowania barwików, zwłaszcza anilinowych, posuwa możność odróżnienia ich od pokrewnych im kształtem tworów, aż do granicy dającéj się osiągnąć przy pomocy dziś znanych nam systemów optycznych. Lecz chociaż nieocenionéj téj zdobyczy, przysporzonéj nam przez Weigerta, w ostatnich dziesiątkach bieżącego stulecia, od-

dać należy słuszny wyraz uznania, to jednak badanie bakteryj w stanie niezabarwionym, zbliżające najwięcéj do ich stosunków normalnych, nie może być pominiętém, gdyż ta droga jedynie prowadzi do poznania najważniejszych ich cech, tj. niezmienionego działaniem odczynników kształtu, ruchu, tworzenia zarodników i kiełkowania tychże. Wprowadzenie w użycie przyrządu oświetlającego Abbégo, wspólnie z zastósowaniem immersyj olejnych, odkryło wiele dawnych błędów, uprościło metodę badania i rozjaśniło niemało ciemnych i podejrzanych stosunków. Tak zwany obraz strukturowy, wytwarzający się skutkiem różnéj siły załamywania światła przez ciecz otaczającą preparat i pojedyncze części składowe preparatu, jaki pospolicie przy zwykłych badaniach histologicznych preparatów niezabarwionych posługując się diafragmą obserwujemy, znika i ustępuje miejsca obrazowi barwnemu, jeśli preparat zabarwimy i usuniemy w zupełności przepony, a na ich miejsce wprowadzimy kondensor oświetlający ze wszech stron preparat silnym stożkiem promieni. Kropelka cieczy olejnéj między szkiełkiem nakrywkowém a soczewką przedmiotową umieszczona a odpowiadająca pod względem siły łamania światła obu tym ośrodkom, zapobiega załamaniu się promieni, zanim osiągną pierwszą sferyczną powierzchnię optycznego układu.

Barwienie preparatów bakteryjologicznych udaje się najlepiéj za pomocą barwików anilinowych zasadowych, a trudno podać w téj mierze pewien rodzaj uniwersalnéj metody, dającéj się w każdym przypadku zastósować. Podobnie jak pod wielu innemi względami poszczególne rodzaje mikroorganizmów okazują swoiste cechy i właściwości, przemawiające dosadnie za odrębnością pojedynczych gatunków, tak téż nie mniéj i pod względem własności przyjmowania barwików zdradzają indywidualne różnice. Tak np. spiryle duru powrotnego barwią się silnie w kropelce krwi roztartéj na szkiełku nakrywkowém rozczynem wodnym fuchsyny, fioletu metylowego lub gencyjany, podczas gdy w tkaninach przy użyciu tychże samych barwików pozostają niezabarwione i dopiero pod wpływem barwików brunatnych anili-

nowych, jak to pierwszy wykazał Koch, słabe przyjmują zabarwienie. Prątki duru brzusznego, w zwyczajnéj ciepłocie barwione, okazują słabe tylko powinowactwo do barwików, po lekkiém ogrzaniu natężenie ich zabarwienia nie ustępuje innym organizmom. *Pneumococci* w obec fuchsyny i fijoletu gencyjany ulegają silnemu zabarwieniu, które dotyczy jednak samego tylko *coccus*, otoczka zaś właściwa tym organizmom pozostaje niezabarwiona. Barwiki brunatne i błękit metylu barwią prawie jednostajnie torebkę i sam *coccus*.

W każdym szczegółowym przypadku wypada przeto zastosować kilka rodzajów i sposobów zabarwienia a wybrać ostatecznie ten, który najwięcéj zaznacza cechy, odpowiadające stosunkom normalnym. Najwięcéj rozpowszechnione w użyciu z barw anilinowych zasadowych są fijołet gencyjany i metylu, błękit metylu, barwik brunatny wesuwin, fuchsyn, rzadziéj zieleń metylu, safranin i dahlia. Rozczyny tychże wodne albo wyskokowe, wodą destylowaną w razie potrzeby rozcieńczane, zwłaszcza przy barwieniu substancyj roztartych na szkiełkach nakrywkowych oddają cenne usługi. Niemniéj w tkaninach zawarte bakteryje barwią się przy ich pomocy energicznie i rażno, jednak również jądra komórek, substancyja podstawowa chrząstki, istoty śluzowe mianowicie śluz w gruczołach i ziarenka protoplazmatu tak zwanych przez Ehrlicha „*Mastzellen*" występują w téjże saméj barwie, zakrywając zwłaszcza wobec silniejszego zabarwienia subtelne i drobne organizmy. Z tych téż powodów metoda Grama, przy któréj pozostają jedynie bakteryje żywo zabarwione, całe zaś tło, wśród którego leżą bezbarwne lub dla lepszego rozpoznania ich rozmieszczenia, następowo innym barwikiem napojone ułatwia niezmiernie odszukanie wśród tkanin najdrobniejszych nawet jestestw drobnowidowych. Do barwienia prątków gruźliczych nadaje się wyłącznie, jak wiadomo, barwik Ehrlicha, złożony z rozczynu wyskokowego fuchsyny lub fioletu metylowego, dodanego do wody anilinowéj aż do nasycenia jéj, chociaż w ostatnich czasach starano się zastąpić w rozczynie tym anilinę fenolem, resorcyną, toluidynem i innemi jeszcze substancyjami.

Weigert wspólnie z Kochem podał modyfikacyję barwika Ehrlicha, polegającą na stałym stosunku fioletu metylowego do wody anilinowéj i dodaniu pewnych ilości wyskoku, przez co barwik téż dłuższy czas w zamkniętém naczyniu przechować się daje nie tracąc zdolności zabarwiania prątków. Loeffler podał skład barwika, który w wielu razach rzeczywiście najlepsze daje rezultaty, a zwłaszcza przy barwieniu trudno tylko przyjmujących barwik prątków nosacizny, tyfusu i spirochetów duru powrotnego nader skutecznym się okazał; jestto wodny rozczyn błękitu metylowego z domieszką ługu potasowego. Częstokroć dodatek kwasu octowego do barwika wpływa korzystnie na siłę zabarwienia, w wielu razach ogrzanie nie wyżéj ponad 40°C. daje względnie najlepsze wyniki, jedném słowem panuje na tém polu zmienność i dowolność, nader rzadko w formy stałe ująć się dająca.

Różnym będzie téż bieg postępowania według tego, czy mamy do czynienia z barwieniem cieczy, jak krwi, ropy lub substancyj miękkich, roztartych na szkiełkach nakrywkowych, czy téż rozchodzi się o barwienie tkanek podejrzanych o zawartość bakteryj.

Cienką warstwą badanego materyjału pokryte szkiełko nakrywkowe pozostawia się powolnemu wyschnięciu, przeciągając je następnie dość szybko ponad płomieniem lampy, celem ustalenia warstwy i zniesienia jéj rozpuszczalności w rozczynach barwikowych. Poddane następnie krótszemu lub dłuższemu działaniu rozczynu wodnego barwika, stosownie do szybkości, z jaką odnośne bakteryje przyjmują rzeczony barwik i spłukane wodą destylowaną nadaje się natychmiast do badania drobnowidowego.

Barwienie bakteryj w tkaninach łączy się niezbędnie z przygotowaniem dostatecznie cienkich przekrojów, które stosownie do użytéj metody różnemi barwikami traktowane, podlegają ostatecznie odwodnieniu, wyjaśnieniu za pomocą olejku goździkowego, cedrowego lub ksylolu i osadzeniu w balsamie kanadyjskim.

Przy badaniu mikroskopowém głównie zwrócić należy uwagę na kształt, ugrupowanie i rozdzielenie napotkanych organizmów, na stosunek ich do otoczenia, na zachowanie się sąsiednich tkanek. Celem stwierdzenia natury, objawów i warunków życia wyśledzonych organizmów starać się należy o oddzielenie ich z chorego ciała, poddanie hodowlom poza ustrojem i przeszczepianie wolnych od wszelkich domieszek, na osobniki możliwie do tegoż samego lub przynajmniéj pokrewnego gatunku należące, jak ten, który pierwszy uległ chorobie. Gdy już pierwéj omówiłem sposoby hodowania bakteryj pozostaje nam jeszcze zająć się sposobem przeszczepiania ich, stanowiącym najważniejszą część badania doświadczalnego.

Wobec doniosłego znaczenia, jakie pociąga za sobą ten właśnie moment badania, rozstrzygający o znaczeniu i roli danego organizmu drobnowidowego, najściślejsze przestrzeganie prawideł antyseptyki, wprawa i biegłość badającego, najsurowsza kontrola własnego doświadczenia jest w możności jedynie zapewnić wynik rzeczywisty i wzbudzający zaufanie. Już sam wybór zwierzęcia do doświadczenia zakreśla dowolności granice o tyle, że znanym jest faktem odporność pewnych rodzajów zwierząt wobec jadów zakaźnych i różny sposób rozszerzania się tychże w organizmie. Jako dowód niech posłuży prątek septicemii Kocha, sprowadzający na pewno śmierć w przeciągu 3—4 dni u myszy domowych, niewzniecający zaś procesu chorobowego u myszy polnych. Niemniéj znaną jest odporność szczurów wobec jadu wąglika, na który nader czule oddziaływają myszy. Septicemija królików wywołana przez swoiste bakteryjum wykryte w wodzie Panki, małego dopływu Sprei, zabija na pewne króliki i myszy, oszczędza zaś szczury i świnki morskie. Króliki i świnki morskie podlegają nader łatwo gruźlicy, któréj mało przystępne są psy, szczury i myszy białe. Niemniéj i wiek zwierzęcia wywiera wpływ na wynik doświadczenia; psy młode łatwo ulegają zakażeniu wąglikowemu, starsze zachowują się odpornie, a te same stosunki znajdujemy u szczurów. W ogólności prawidłem na punkcie

przeszczepienia, niestety rzadko dawniéj a i dziś niezupełnie jeszcze przestrzeganém, winno być użycie zwierząt tego samego lub przynajmniéj pokrewnego rodzaju, jak to z którego materyjał zakaźny powzięto. Przeniesienie duru powrotnego na małpy, daremnie przedtém na różne rodzaje zwierząt przeszczepianego, przemawia nader pouczająco o słuszności i potrzebie uwzględnienia powyższych zastrzeżeń.

Co do sposobu i miejsca przeszczepiania pierwiastku zakaźnego, najodpowiedniéj byłoby bezsprzecznie naśladować stosunki w naturze napotykane. Gdy te jednak często są nam bliżéj nieznane, to nie pozostaje nic innego, jak przeprowadzić cały szereg doświadczeń, modyfikowanych w różny sposób. Najczęstszą formą przenoszenia jadu na zwierzęta próbne jest szczepienie, przez które rozumie się powierzchowne zranienie przyskórka, z następowém wprowadzeniem do ranki pierwiastku przeszczepianego. Niemniéj często wykonywa się wstrzyknięcie podskórne, wstrzyknięcie do jamy brzusznéj, opłucnéj lub stawowéj. Materyjał pochodzący z hodowli czystych, rozcieńczony destylowaną i świeżo przegotowaną wodą, można również z korzyścią wstrzykiwać do większych żył. Karmienie zwierząt materyjałem zakaźnym i wdechanie tegoż w stanie rozpylonym znajduje zastosowanie w poszczególnych rodzajach bakteryj. Szczepienie w komorę przodkową oka, w rogówkę lub skórę ucha, daje korzystne rezultaty tam, gdzie rozchodzi się o wybadanie lokalnego działania materyjału zakaźnego. Bez względu na to, w jaki sposób jad zakaźny został przeniesiony, nie można zadowolić się nigdy jedném pojedynczém doświadczeniem, jakoteż zapominać o odpowiedniéj kontroli, gdyż inaczéj słusznym byłby zarzut, że jednokrotny wynik może być często przypadkowy i dla tego złudny. Również śmierć pojedyńczego zwierzęcia nie dowodzi jeszcze wcale siły zakaźnéj wszczepionego materyjału, gdyż zarówno nieuorganizowane jady wywierają podobne działanie. Dowód będzie dopiero wówczas zupełnym, gdy przeszczepienie w drugim szeregu z jednego osobnika na drugi, dokonane za pomocą

tak małéj ilości materyjału, że o rozmnażaniu się jego w chorém ciele powątpiewać nie podobna, przyniesie zawsze jeden i ten sam wynik. Przeprowadzenie oględzin pośmiertnych w każdym poszczególnym przypadku, badanie mikroskopowe i chemiczne krwi, cieczy tkaninowéj z miejsca przeszczepienia, śledziony, płuc i innych narządów, poddanie hodowli tamże znalezionych organizmów, kończy bieg wytknięty badaniu, określa formę, życie i naturę działania odkrytego ustroju.

Rezultatem omówionych metod i sposobów dziś powszechnie już przyjętych i ocenionych, są klasyczne i wzorowe prace Kocha, jak niemniéj wynik doświadczeń podjętych pod cennym kierunkiem przez jego uczniów, wiernie wstępujących na wypróbowaną przezeń drogę. Z dniem każdym wzrasta téż liczba jego zwolenników, szczupleje garstka sceptyków, odrzucających zasadniczo cały kierunek i naukę, będącą naturalnym jego wypływem. Przewrót w dotychczasowych pojęciach, wyrzeczenie się głęboko zakorzenionych wyobrażeń i poglądów, niczém wprawdzie nieuzasadnionych, nie może obyć się bez walki, do któréj zbroi się strona jedna coraz to silniéj w świeże, gruntowne podstawy doświadczenia, druga przynosi jedynie pamięć poprzedniego uznania. W każdym razie budzi się żywszy ruch niemogący wyjść na szkodę gałęzi pełnéj wprawdzie przyszłości, lecz dziś jeszcze niebędącéj w chwili ukończonego rozwoju. Wyrugowanie z nauki chorób zakaźnych, banalnych lub fantastycznych pojęć co do przyczyny tychże, przyobleczenie zagadkowego przedtém contagium, mającego wytwarzać się z chorego ciała, w kształt i postać żywego ustroju roślinnego, oto na razie zdobycze bakteryjologii, na podstawie których podał pierwszy Lister sposób antyseptycznego leczenia ran, sposób powstrzymujący rozwój zakażających organizmów i osiągnął świetne wyniki. Jeśli rzucimy okiem na krótki szereg spraw, w części zupełnie wyjaśnionych, w części wymagających uzupełnienia, a z drugiéj strony zmierzymy cały ogrom prac, czekających rozwiązania i uwzględnimy razem trudność przedmiotu badanego, którego wolny postęp nie zaspakaja

życzeń szybkiego rozjaśnienia, to nie dziw, że tak mało korzyści dla terapii starali się dotąd wyciągnąć bakteryjolodzy ze znanych dziś pewników. Pomijając, że pole to więcéj przystępne i swoiste dla klinicysty, brak odpowiednego materyjału i doświadczenia niemały stanowią tu skopuł. Wobec skeptycyzmu i nieufności ubezwładniającéj wszelkie zabiegi, bez poparcia ze strony innych gałęzi, mogących wyjaśnić wiele nasuwających się stosunków, skazani po większéj części na własne siły i pomoc zaniedbali dotąd tę ważną stronę, nadającą całéj nauce wartość i pierwszorzędne znaczenie. Rozbudzone zajęcie się nauką mikroorganizmów w ostatnich czasach wróży i w tym kierunku cenne a płodne w następstwa rezultaty.